

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: **0 501 250 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(13) Anmeldenummer: **92102449.3**(51) Int. Cl.⁵: **C07K 9/00, C07D 487/04, A61K 37/02**(14) Anmeldetag: **14.02.92**(40) Priorität: **27.02.91 DE 4106101**(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.09.92 Patentblatt 92/36(54) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE(71) Anmelder: **BAYER AG****W-5090 Leverkusen 1 Bayerwerk(DE)**(72) Erfinder: **Lerchen, Hans-Georg, Dr.**
Morgengraben 14
W-5000 Köln 80(DE)
Erfinder: **Baumgarten, Jörg, Dr.****Henselweg 13****W-5600 Wuppertal 1(DE)**Erfinder: **Piel, Norbert, Dr.****Neuenhausstrasse 28****W-4006 Erkrath 1(DE)**Erfinder: **Lorentzen, Jens-Peter, Dr.****An der Ruthen 2****W-5000 Köln 80(DE)**Erfinder: **Antonicek, Horst-Peter, Dr.****Wiesenwinkel 14****W-5060 Bergisch Gladbach(DE)**Erfinder: **Kabbe, Hans-Joachim, Dr.****Walter-Flex-Strasse 16****W-5090 Leverkusen 1(DE)**(54) **Fucose-markierte Batracylinderivate.**

(57) Das heterocyclische Amin Batracylin zeigt ausgezeichnete Antitumorwirkung im Colon-38-Modell an der Maus; dieses Modell gilt als repräsentativ für die Wirkung gegen Dickdarmkrebs. Diese Wirkung läßt sich durch eine Markierung mit Fucose verbessern.

Die neuen Verbindungen haben die Formel:

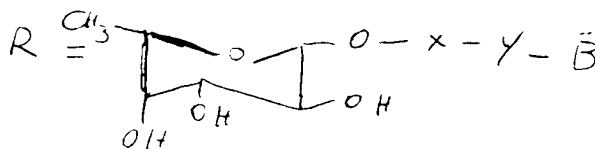
$[R]_n-AA_1-AA_2-C$,

wo:

C = Batracylin

AA₁ und AA₂ = gegebenenfalls geschützte L- oder D-Aminosäuren

n = 0-2



B = Bindung oder Diacylrest einer Dicarbonsäure.

β -L-Fuc- ω -AHex-Suc-OH

Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid wie in Beispiel 26

5 β -L-Fuc- ω -AHex-Suc-Ala-Batracylin

Kupplungsreaktion wie in Beispiel 1 beschrieben
Die Beispiele 30 und 31 werden analog hergestellt.

10 Beispiel 30

H-Glu(β -Fuc- ω -AHex)-Ala-Batracylin

(Kupplungsbaustein: Boc-Glu-Ala-Batracylin)

15

Beispiel 31

H-Glu(β -Fuc-pAP)-Leu-Batracylin

20 (Kupplungsbaustein: Boc-Glu-Leu-Batracylin)

Material und Methoden zur biologischen Testung

Die Zelllinie SW 480 (CCL 228) stammt aus einem humanen Adenocarcinom des Dickdarms. Sie wurde
25 in der Zeit von 1971-1975 von A. Leibovitz isoliert und wird von ATCC in der 96. Passage geliefert.

In den Experimenten wurde sie in der 104. bis zur 111. Passage eingesetzt. Als Nährmedium diente L 15 (Gibco) mit 10 % foetalem Kälberserum (L 15/FCS 10). Die Kontrollzelllinie BHK wurde in DMEM/FCS10 Medium angezoogen. Sie befand sich in der Passage 109-116.

30 Kulturbedingungen für Wachstumsinhibitionsteste

SW 480 Zellen wurden in Rouxschalen in L15/FCS10 Medium gezogen. 24 Stunden vor Gebrauch wurde das Medium gewechselt und zusätzlich 0,1 % BSA zugesetzt. Anschließend wurde typsiniiert und in MEME (Flow) unter Zusatz von 10 % FCS und 0,1 % BSA zu einer Zellzahl von 100 000 Zellen/ml
35 aufgenommen. 100 μ l Zellsuspension/Well wurden in eine 96 Mikrowellplatte gegeben und 3 Tage bei 37°C im CO₂ Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde 100 μ l MEME Medium in 1 μ l DMSO mit den Prüfsbstanzen (Glycokonjugaten) zugesetzt. Das Wachstum wurde täglich überprüft.

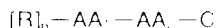
Konfluente Vorkulturen von BHK wurden trypsiniiert und in GMEM (Flow) Medium im 10 % Tryptose (Gibco), 10% Newborn Calf Serum, 0,5 % L-Glutamin-Lösung 100 x (Gibco), 0,75 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (Gibco) und 0,1 % BSA zu einer Zellzahl von 100 000 Zellen/ml aufgenommen. 100
40 μ l Zellsuspension/Well wurden in 96 Well/Mikrotiterplatten gegeben und 24h bei 37°C im CO₂ Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden 100 μ l GMEM-Medium und die Prüfsbstanzen in 1 μ l DMSO pro Mikrowell zugesetzt. Das Wachstum wurde täglich überprüft.

45

Wachstumsinhibitionsteste

Zu jedem Mikrowell wurde alle 24h 40 μ l MTT-Lösung (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml H₂O zugesetzt. Es wurde 5 Stunden im CO₂
50 Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 100 μ l i-Propanol/Well zugesetzt. Nach 30 min Schütteln wurde die Extinktion bei 545 nm mit einem Titertek Multiskan MCC-340 (Flow) gemessen.



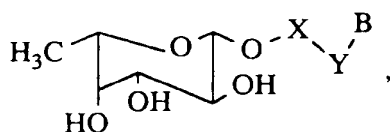
mit

C = ein Cytostatikum,

R =

5

10



X = Alkylen, Arylen

Y = CO, NH, O

B = Bindung oder Diacylrest einer Dicarbonsäure,

AA₁ = ein natürlicher Aminosäure-Rest in der L- oder D-Konfiguration oder Bindung

und

AA₂ = ist eine natürliche Aminosäure in der D- oder L-Konfiguration oder Bindung,

n = 0, 1, 2.

20

2. Verbindungen gemäß Anspruch 1

25

worin bedeutet

X = p-Phylen oder (CH₂)_m,
wobei m 1-20 sein kann

Y = CO, NH,

B = Bindung oder Diacylrest einer C₃-C₆-Dicarbonsäure,

n = 0, 1, 2.

30

3. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 und 2

worin bedeutet

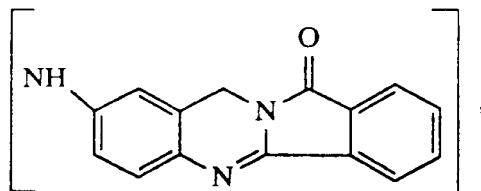
AA₁ = Aminosäure-Reste mit sauren oder basischen Seitenketten oder Bindung,

AA₂ = Aminosäure-Reste wie Ala, Val, Leu, Ile, Nva, Gly, Phe (D oder L-Konfiguration), die amidartig mit dem Heterocyclus und mit AA₁ verknüpft sind.

35

4. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 worin C für

40



45

50

steht.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT Nummer der Anmeldung

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

EP 92 10 2449

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
A	EP-A-0 365 956 (BAYER) * Das ganze Dokument * & US-A-4 980 343 (BAYER) (Kat. D) ---	1-4	C 07 K 9/00 C 07 D 487/04 A 61 K 37/02
A	EP-A-0 359 347 (NEORX) * Ansprüche * ---	1-4	
A	THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, Band XLII, Nr. 12, Dezember 1989, Seiten 1823-1830, Toyko, JP; J.C. FLORENT et al.: "Synthesis and antitumor activity of new anthracyclines" * Das ganze Dokument * -----	1-4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			C 07 K C 07 D A 61 K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 4 Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 1-3 Nicht recherchierte Patentansprüche: Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Das Glied C der Formel im Anspruch I ist unklar definiert, deswegen wurde die Recherche nur auf C = Batracylin beschränkt.</p>			
Recherchemort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 28-05-1992	
		Prüfer MASTURZO P.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
1. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
2. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
3. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
4. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
5. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
6. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
7. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
8. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
9. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
10. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
11. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
12. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
13. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
14. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
15. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
16. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
17. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
18. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
19. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
20. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
21. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
22. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
23. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
24. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
25. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
26. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
27. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
28. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
29. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
30. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
31. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
32. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
33. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
34. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
35. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
36. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
37. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
38. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
39. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
40. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
41. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
42. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
43. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
44. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
45. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
46. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
47. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
48. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
49. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
50. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
51. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
52. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
53. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
54. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
55. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
56. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
57. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
58. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
59. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
60. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
61. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
62. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
63. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
64. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
65. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
66. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
67. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
68. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
69. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
70. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
71. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
72. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
73. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
74. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
75. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
76. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
77. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
78. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
79. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
80. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
81. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
82. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
83. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
84. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
85. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
86. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
87. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
88. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
89. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
90. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
91. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
92. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
93. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
94. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
95. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
96. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
97. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
98. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
99. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			
100. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundprinzipien			